

Ensayo para 1 determinación individual presentada en vial liofilizado monotest.

Clasificación del producto:

*Países miembros de la Unión Europea: "Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro"
*Países que no pertenecen a la Unión Europea: "Para Uso Exclusivo en Investigación"

INTRODUCCIÓN

Alfa Fetoproteina es la proteína sérica más abundante en el feto y muestra una gran similaridad en propiedades físicas con la seroalbúmina.

En el adulto la concentración sérica de Alfa fetoproteina es muy baja, salvo cuando el paciente presenta hepatocarcinoma o teteratoma.

Los genes que codifican para la AFP y la Seroalbúmina son genes sinténicos y se sitúan en el brazo largo del cromosoma 4. Después del nacimiento el organismo invierte las producciones de AFP que declina rápidamente y aumenta considerablemente la producción de Seroalbúmina.

Existen anticuerpos comerciales contra la AFP para el diagnóstico de tumores de esta proteína pero casi siempre producen un gran fondo tisular que imposibilita una correcta visión.

Histosonda Alfa Fetoproteina es un fragmento de DNA monocatenario de 311 nucleótidos de longitud que va dirigido contra el RNA de la AFP.

Su utilidad se centra en el diagnóstico de los tumores primitivos del hígado y de los tumores embrionarios de las gónadas. Hasta el 70% de los hepatocarcinomas son productores de AFP. Su utilización junto con la Histosonda Seroalbumina permite un diagnóstico correcto de los tumores primitivos de hígado y su diagnóstico diferencial con tumores metastáticos en el hígado.

Los tumores embrionarios de las gónadas y línea media pueden mostrar un importante grado de complejidad y distintos niveles de diferenciación no bien reconocibles con las técnicas histológicas convencionales. La Histosonda Alfa Fetoproteina permite identificar el número y localización de células productoras de AFP en un corte tisular.

FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico in Vitro
La Histosonda AFP es útil para el diagnóstico de los tumores primitivos del hígado y de los tumores embrionarios de las gónadas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda AFP ha sido diseñada para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional y debe ser manipulado por personal cualificado y debidamente entrenado.

Para la obtención de unos resultados adecuados, deben seguirse fielmente las instrucciones del manual. Cualquier cambio en las temperaturas o tiempos indicados, o en cualquier otro paso del proceso, puede dar lugar a resultados erróneos.

COMPONENTES

1 tubo monotest de la Histosonda AFP liofilizada.

La Histosonda AFP consiste en un segmento de DNA de una sola cadena complementaria al RNA que se expresa de esta proteína y tiene una longitude de 311 nucleótidos. Esta sonda ha sido marcada con Digoxigenina.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos suministrados se almacenan a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. Tras su reconstitución la sonda permanecerá estable durante dos semanas a 4ºC en un medio libre de DNAasas. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

MUESTRAS

Cualquier corte de un bloque de parafina en el cual se desee estudiar la presencia de RNA de la Alfa Fetoproteina. Cortes de 4-6 micrómetros de espesor son adecuados para el estudio.
El corte es preferible que sea reciente (no más de treinta días) aunque los resultados del ensayo no se ven afectados por la antigüedad del bloque. Se han realizado estudios en las instalaciones del fabricante utilizando bloques de parafina de 20 años de antigüedad con óptimos resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras en las que se observe expresión de la Alfa Fetoproteina deberán mostrar una coloración marrón en el citoplasma celular que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. El facultativo valorará los resultados en base a su experiencia a partir de la visualización de las señales observadas en la muestra, en paralelo con las señales observadas en las muestras de control positivo y control negativo para la expresión de este gen.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

La Histosonda AFP ha sido optimizada para detectar la expresión de su RNA en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. No se recomienda la utilización de otro tipo de muestras o de técnicas de preparación. El funcionamiento del producto ha sido validado utilizando los protocolos indicados en el manual de instrucciones.

La utilización de otros procedimientos o las modificaciones de los protocolos recomendados, pueden conducir a resultados erró neos.

Los resultados de este ensayo deben ser evaluados por el facultativo en combinación con el resto de datos clínicos del paciente de los que se disponga.

Para la obtención de unos resultados óptimos y reproducibles es muy importante ajustarse rigurosamente a las condiciones de tiempos y temperaturas indicadas en el procedimiento.

Fecha de emisión: 01/03/2010

INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de las sondas marcadas con Digoxigenina.

PRINCIPIO DEL MÉTODO
La Hibridación In Situ Cromogénica (CISH), es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN, o estudiar la expresión de un gen así como la evaluación simultánea de la morfología del tejido mediante el uso de microscopía de campo claro.

La sonda marcada, de secuencia conocida, se hibrida con su diana en el tejido problema. Esta unión se detecta mediante un proceso inmunohistoquímico.

Las histosondas, cuya diana es el RNA mensajero, están destinadas a hacer visibles los genes que se expresan detectando la expresión génica.

Protocolo de HistoSonda
Antes de comenzar, precaliente la cámara húmeda a 62ºC.

1. Reconstitución de la sonda
1. Añada 65μl de agua destilada (de buena calidad) al vial de Histosonda, dé un pequeño vórtex y centrifugue si fuese necesario.

2. Desparafinación
1. Caliente los portaobjetos a 62ºC durante 10mins utilizando una placa caliente o un incubador.
2. Introduzca los portaobjetos en el siguiente orden en:

a. Xileno: 10 mins
b. Xileno: 5mins
c. Alcohol absoluto (etanol o isopropanol): 1min X 2 veces
d. Alcohol 96%: 1min X 3 veces
e. Metanol con 0.3% H2O2 o 3% H2O2 solo : 5mins

3. Lave enérgicamente los portaobjetos con agua (destilada o corriente), manténgalos en agua 1min.

2b.Inhibición de uniones inespecíficas de DNA (opcional)

Por lo general este paso no es necesario, a menos que el tejido que vaya a hibridar contenga una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (generalmente médula ósea y tejidos gástricos).

1. Coloque los portaobjetos en 200ml de agua destilada en un microondas hasta que el líquido hierva de manera uniforme (normalmente unos 2 min).
2. Cambie los portaobjetos inmediatamente a agua a temperatura ambiente.
3. Como alternativa puede introducir los portaobjetos en agua destilada hirviendo durante 30 segundos e inmediatamente transfiéralos a agua destilada a temperatura ambiente.

¡Importante: un tratamiento térmico excesivo puede provocar una tinción de fondo. Saque los portaobjetos de manera inmediata.

3. Desproteinización
1. Reconstituya la Proteinasa K de Cenbimo con 200μl de PBS (1 vial por cada portaobjetos).
2. Retire el exceso de agua de cada portaobjetos con un pañuelo de papel.
3. Cubra el tejido con 200μl de Proteinasa K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con agua.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

(Importante: si los cortes han sido tratados previamente con calor en microondas, use la Proteinasa K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. Las médulas óseas fijadas en ácido fórmico o EDTA requieren una digestión de 20 min a 55ºC con Proteinasa K)

4. Incubación con la sonda
1. Retire el exceso de buffer del portaobjetos con un pañuelo de papel.
2. Añada los 65μl de la sonda al corte asegurándose de que todo el tejido queda cubierto y de que no quedan burbujas de aire.
3. Coloque los cristales en posición horizontal en una cámara húmeda y cierre bien.
4. Incube a 62ºC durante 1 h.
5. Si no dispone de una cámara húmeda apropiada, ponga una gota (65μl) de sonda sobre un cubreobjetos de 24x50 mm y colóquelo sobre el tejido. Selle los bordes del cubreobjetos con pegamento. Incube en una estufa a 62ºC o en una placa caliente durante una hora. Después de la incubación, retire con cuidado el pegamento y el cubreobjetos y continúe con el protocolo.

5. Lavado de la sonda
1. Lave la superficie del tejido vigorosamente con PBS pH 7.4 para retirar toda la sonda.
2. Agite en PBS durante 5mins.

Revelado de la sonda
Protocolo para el revelado manual de la sonda. Como alternativa puede utilizar un aparato automático de inmunohisoquímica.
1. Reconstituya el anticuerpo Anti-Digoxina de Cenbimo con 1 ml de agua destilada. Cada vial es válido para 10 portaobjetos.
2. Retire el exceso de buffer de los cortes como anteriormente.
3. Cubra el tejido con 100μl de Anti-Digoxina e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con PBS, y agite en PBS pH 7.4 y agite en PBS durante 1min.
5. Retire el exceso de buffer de los cortes.
6. Ponga una gota de un polímero comercial anti-ratón HRP sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100μl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
7. Lave vigorosamente con PBS, agite en PBS durante 1min.
8. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.
9. Lave con agua.
10. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluída al 50% en agua.
11. Lave con agua, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

www.cenbimo.com
www.histosonda.com













Fabricante: CENBIMO S.L.
C/ Doctor Iglesias Otero, s/n
27004 Lugo, Spain



Assay for 1 individual reaction in lyophilized single test vial.

Product classification:

*EU countries: "For In Vitro Diagnostics"
*Non- EU countries: "For Research Use Only"

INTRODUCTION

Alpha Fetal Protein is the most abundant seric protein in the fetus which demonstrates great similarity to the physical properties of serum albumin.

In the adult, the seric concentration of AFP is very low, apart from when the patient presents with a hepatocarcinoma or teteratoma.

The genes that code for AFP and serum albumin are syntenic genes that are situated on the long arm of chromosome 4.

After birth the organism inverts the production of AFP so that it declines rapidly and also considerably increases the production of serum albumin.

There are commercial antibodies against AFP for the diagnosis of tumors that produce this protein but they almost always produce so much tissue background that a clear view becomes impossible.

Histosonda Alpha Fetoprotein is a single stranded DNA fragment of 311 nucleotides that is targeted against the RNA of AFP.
Its use is centered on the diagnosis of primitive liver tumors and embryonic tumors of the gonads.

Up to 70% of hepatocarcinomas are producers of AFP. The use of this probe combined with Histosonda Serum Albumin permits a correct diagnosis of primitive liver tumors and their differencial diagnosis with metastatic tumors in the liver.

The embryonic tumors of the gonads and midline can show an important degree of complexity and distinct levels of differentiation not well recognisable with conventional histological techniques. Histosonda Alpha Fetal Protein permits the identification of the number and localization of cells producing AFP in a tissue section.

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis.
Histosonda AFP is useful for the diagnosis of primitive liver tumors and embryonic tumors of the gonads.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda AFP has been designed for professional use in In Vitro Diagnosis and must be manipulated by qualified and accordingly trained personnel. In order to obtain the best results, the instructions contained in the manual must be followed. Any change to the indicated temperatures, times or any other step of the process can lead to poor results.

COMPONENTS

1 single test tube of lyophilized Histosonda AFP.
Histosonda AFP consists of a segment of single-stranded DNA complementary to expressed RNA with a length of 311 nucleotides. This probe has been labeled with Digoxigenin.

STORAGE CONDITIONS

Supplied reagents are stored at room temperature until expiration date. After being reconstituted the probe will remain stable at 4ºC for two weeks in a DNAase-free environment.
Do not use after expiration date.

SAMPLES

Any paraffin block section in which Alpha Fetal Protein RNA presence is to be studied. Sections of 4-6 micrometers in width are sufficient to conduct the study. Preferably, the cut should be recent (no more than thirty days old). Assay results are not affected by block age. Studies have been carried out in the manufacturers' laboratories using 20 year old paraffin blocks with optimal results.

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which Alpha Fetal Protein expression is observed will show a brownish color in the cell cytoplasm, which will contrast over the blue-violet background given by hematoxylin staining. The pathologist will evaluate the results according to their experience, drawing conclusions from the staining of the sample, in parallel with the staining observed in the positive and negative controls.

ASSAY LIMITATIONS

Histosonda AFP has been optimized to detect RNA expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Its use is not recommended for other types of samples or preparation techniques.

The correct operation of this product has been validated using the protocols indicated in the instructions manual. The use of other procedures or the modification of the recommended protocols may lead to erroneous results.

The results from this assay must be evaluated by the pathologist in combination with the rest of available patient clinical data.
In order to obtain optimal and reproducible results it is important to rigorously maintain the time and temperature conditions indicated in the procedure.

Emission date: 01/03/2010

PROCEDURE

For Digoxigenin- labeled probes

BASIS OF THE METHOD

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) is a technique used to determine the presence of a DNA or RNA sequence or to study gene expression, as well as for the simultaneous evaluation of tissue morphology by white light microscopy. A labeled probe of known sequence hybridizes with its target in the tissue being studied. This hybridization is then detected by an immunohistochemical process.

The Histosondas targets are messenger RNA and they are therefore designed to detect and visualise gene expression.

HistoSonda Protocol

Before starting pre-heat the humid chamber to 62ºC.

1. Reconstitute the probe
1. Add 65µl of (good quality) distilled water to the HistoSonda tube, briefly vortex and centrifuge if possible.

2. Deparaffinization
1. Heat slides at 62ºC for 10mins using a hot plate or incubator.
2. Immerse slides in:
a. Xylene: 10 mins
b. Xylene: 5mins
c. Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
d. Alcohol 96%: 1min X 3
e. Methanol containing 0.3% H_2O_2 or 3% H_2O_2 only :5mins
3. Wash well with distilled water, leave standing in water.

2b. Inhibition of unspecific DNA binding (optional)

Generally this step is not necessary unless the tissue to be hybridized contains a great quantity of polymorphonuclear eosinophil leukocytes (generally bone marrow and gastric tissues).
1. Place slides in 200ml distilled water in a microwave until the liquid boils uniformly (normally around 2mins).
2. Immediately transfer slides to distilled water at room temperature.
3. Alternatively place slides in boiling distilled water for 30 seconds and immediately transfer to distilled water at room temp.

! Important: excess heat treatment will result in background staining. Remove slides immediately. !

3. Deproteinization
1. Reconstitute Proteinase K from Cenbimo with 200µl of PBS (1 vial for each slide).
2. Remove excess water from individual slides with tissue paper.
3. Cover tissue sections with the 200 µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
4. Wash well with water.
5. Transfer to PBS pH 7.4 for 2mins.

! (Important: if the slides have been boiled in the microwave previously only use Proteinase K for 5 minutes as the heat treatment will have significantly sensitized the tissue sections. For bone marrows continue to use 10mins after heat treatment. Bone marrows fixed in formic acid or EDTA require a Proteinase K digestion of 20min at 55ºC.) !

4. Incubation with the probe
1. Remove excess buffer from sections as described previously.
2. Add the 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is completely covered and avoiding air bubbles.
3. Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
4. Incubate at 62ºC for 1hr.
5. If no suitable humid chamber is available drop the 65µl of probe over a 24 X 50 mm coverslip and place over the tissue section. Seal the edges of the coverslip with rubber cement. Incubate in a 62ºC incubator or over a hot plate for 1 hour. After incubation carefully remove the rubber cement and coverslip and continue the protocol.

5. Washing the probe
1. Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
2. Agitate in PBS for 5mins.

6. Revealing the probe
Protocol for manual revealing of the probe. Alternatively, an automatic immunohistochemistry apparatus may be used.

1. Reconstitute Anti-Digoxin from Cenbimo with 1ml of distilled water. Each vial is valid for 10 slides.
2. Remove excess buffer from sections as before.
3. Cover sections with 100µl of Anti-Digoxin and incubate in a humid chamber for 30mins at room temp.
4. Wash vigorously with PBS, pH 7.4 agitate in PBS for 1min.
5. Remove excess buffer from sections.
6. Drop commercial polymer anti-mouse HRP over the sections (enough to cover the tissue 50-100µl) incubate in a humid chamber following the manufacturer's instructions.
7. Wash vigorously with PBS, agitate in PBS 1min.
8. Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) following the manufacturer's instructions.
9. Wash with water.
10. Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in water.
11. Wash with water, dehydrate and cover slip following normal laboratory protocols.

www.cenbimo.com
www.histosonda.com














Fabricante: CENBIMO S.L.
C/ Doctor Iglesias Otero, s/n
27004 Lugo, Spain